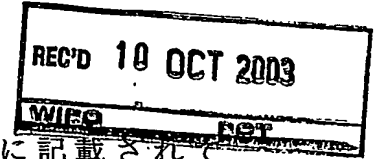


25.08.03

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月26日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-245706

[ST. 10/C]: [JP2002-245706]

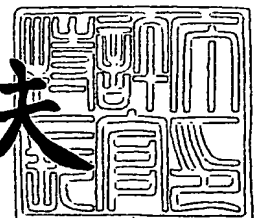
出 願 人
Applicant(s): 林崎 良英

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月25日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願
【整理番号】 P14085
【提出日】 平成14年 8月26日
【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿
【国際特許分類】 G01N 27/00
【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 8

【氏名】 林崎 良英

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県毛呂山町川原 8 6 7 - 8 0

【氏名】 谷畑 勇夫

【特許出願人】

【識別番号】 597157174

【氏名又は名称】 林崎 良英

【代理人】

【識別番号】 100087000

【住所又は居所】 東京都豊島区西池袋 1 - 5 - 1 1 - 4 0 4

【弁理士】

【氏名又は名称】 上島 淳一

【電話番号】 03-5992-2315

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 058609

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、

タンパク質を固定したチップに対して該超短パルスレーザー光を照射して、該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析する

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項2】 請求項1に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記タンパク質を固定したチップは、該チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質に、該特定のタンパク質が反応して結合することにより、該チップ上に該特定のタンパク質が固定されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項3】 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質は、タンパク質と特異的な結合性を持った分子である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項4】 請求項3に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記タンパク質と特異的な結合性を持った分子は、タンパク質と特異的な結合をする核酸である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項5】 請求項2に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質は、タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項6】 請求項5に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質は、抗体であるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項7】 請求項6に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記タンパク質を固定したチップは、前記抗体を固定したチップに前記抗体と反応するタンパク質を含む溶液をかけて、前記抗体と反応するタンパク質と前記抗体とを反応させ、前記抗体と反応するタンパク質と前記抗体とを結合させてなるものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項8】 請求項1～7のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記チップに固定されたタンパク質は、元素標識を付けたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項9】 請求項8に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、安定同位元素標識である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項10】 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、ピューロマイシン誘導体を用いて標識されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項11】 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、サンドイッチ法により標識されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項12】 請求項8～9のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記元素標識は、サンプル中のタンパク質に直接標識されたものである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項13】 請求項8～12のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記チップは、マルチチャンネル化したチップである

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項14】 請求項1～10または請求項13のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

分析の対象であるタンパク質を含むサンプルと該分析の対象であるタンパク質に標識を付けた標識タンパク質溶液とを混合して前記チップにかけて、前記に固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質と前記分析の対象であるタンパク質と前記標識タンパク質とを競合的に結合させる competitive assayを行い、前記チップ上に該特定のタンパク質を固定する

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項15】 請求項1～14のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が10メガワット以上である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項16】 請求項15に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする

超短パルスレーザー光は、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項17】 請求項1～16のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象であるタンパク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象であるタンパク質を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行う

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【請求項18】 請求項1～17のいずれか1項に記載のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において、

前記イオン化した構成元素の分析は、飛行時間法による質量分析である

レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、レーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関し、さらに詳細には、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することを可能にしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関し、例えば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質の質量分析に用いて好適なレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

近年、質量分析法の応用範囲は、物理や化学の分野から医学や生化学などのライフサイエンスの分野へと急速に広がってきている。特に、タンパク質の分子量の決定解析やアミノ酸配列の決定解析などへの発展は著しい。

【0003】

こうした質量分析法の原理は、試料を様々な方法でイオン化して、イオン化に

より得られたイオンを質量／電荷に従って分離し、分離した各イオンの強度を測定するというものである。

【0004】

ところで、従来のタンパク質の質量分析は、タンパク質そのものに電子を付加してイオン化し、その質量を解析したり、高分子量の分子を低分子量の分子イオンに細分化して質量分析を行い、構成分子を比較するというものであった。

【0005】

ここで、従来のタンパク質の質量分析におけるイオン生成方法としては、例えば、タンパク質に高エネルギー原子イオンを衝突させてイオン化する2次イオン質量分析(SIMS)法や、電子衝撃によって低分子量の分子イオンに細分化して質量分析を行う電子イオン化(ED)法、マトリックス支援レーザーイオン化(MALDI)法などが知られている。

【0006】

しかしながら、上記したいずれの方法においても、高分子イオンを質量分析するため高分解能の質量分析装置が必要であるという問題点や、中途半端に分解生成したフラグメントイオンの存在が質量スペクトルの解析を困難にするという問題点などがあった。

【0007】

一方、従来より、化学分析に際して同位元素で標識した試料の質量分析方法としては、例えば、ナノ秒レーザーにより原子化およびイオン化を行うレーザー原子化共鳴イオン化(LARIMP)法が知られている。

【0008】

しかしながら、このLARIMP法によれば、レーザーとして、標識元素を原子化するための原子化レーザーと原子化された標識元素の原子をイオン化するための共鳴イオン化レーザーとの2台のレーザー源が必要となるため、システム構成が複雑になるという問題点があった。

【0009】

さらに、LARIMP法においては、上記したように標識元素の原子を共鳴イオン化する必要があるため、各標識元素の原子に対して固有の波長のレーザー光を照射する必要があるため、多種類の標識同位体が混入した状況では効率の良い分析を行うことが極めて困難であるという問題点があった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、上記したような従来の技術の有する種々の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、高分解能の分析装置を用いることを要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。より詳細には、例えば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質の質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除するとともに、質量分析装置に高分解能を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の質量分析方法を提供しようとするものである。

【0011】

また、本発明の目的とするところは、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を構成する構成原子の原子化とイオン化とを1台のレーザー源で同時に実現することを可能にして、レーザーの照射制御を大幅に簡潔にすることを可能にしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。

【0012】

さらに、本発明の目的とするところは、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことを可能にしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を提供しようとするものである。

【0013】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、それらタンパク質を原子イオン化して原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたものである。これにより、各種のタンパク質の化学分析を行うことができるものである。

【0014】

即ち、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることにより、タンパク質をバラバラに分解して当該タンパク質を構成する各原子毎に原子化すると同時に、原子化した原子を1価のイオンにイオン化するものであり、このイオン化により生成された原子イオンを分析することにより、定量分析が可能となるものである。

【0015】

従って、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法において質量分析を行う場合には、低質量の原子イオンを質量分析することになり、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるのみならず、高分解能を備えた質量分析装置を用いる必要がなくなる。

【0016】

また、上記したように、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、一種類の超短パルスレーザー光でタンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質の原子化と同時に、原子化された原子の一価のイオンへのイオン化を効率良く行うことが可能となる。従って、レーザーの照射制御が簡潔になるとともに、例えば、化学分析に際して多種類の標識元素を同時に使用することが可能となるため、解析効率を著しく向上することができる。

【0017】

つまり、本発明のレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法においては、標識元素の原子化とイオン化とを一種類の超短パルスレーザー光で同時

に行うことができるため、分析作業を大幅に簡略化することが可能となり、従来と比較すると分析の効率を著しく向上することができるようになる。

【0018】

さらに、上記したイオン化は、超短パルスレーザー光の高い尖頭値強度によって非共鳴過程によって行われるイオン化（非共鳴イオン化）であるので、多種類の標識同位体が混入した状況においても各標識原子をそれぞれイオン化することができ、多標識系への応用が容易であり、高精度かつ高効率な高分子の分析を行うことができるようになる。

【0019】

即ち、本発明のうち請求項1に記載の発明は、分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、タンパク質を固定したチップに対して該超短パルスレーザー光を照射して、該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するようにしたものである。

【0020】

また、本発明のうち請求項2に記載の発明は、本発明のうち請求項1に記載の発明において、上記タンパク質を固定したチップを、該チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質に、該特定のタンパク質が反応して結合することにより、該チップ上に該特定のタンパク質が固定されたものとしたものである。

【0021】

また、本発明のうち請求項3に記載の発明は、本発明のうち請求項2に記載の発明において、上記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質を、タン

パク質と特異的な結合性を持った分子としたものである。

【0022】

また、本発明のうち請求項4に記載の発明は、本発明のうち請求項3に記載の発明において、上記タンパク質と特異的な結合性を持った分子を、タンパク質と特異的な結合をする核酸としたものである。

【0023】

また、本発明のうち請求項5に記載の発明は、本発明のうち請求項2に記載の発明において、上記特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質を、タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質であるとしたものである。

【0024】

また、本発明のうち請求項6に記載の発明は、本発明のうち請求項5に記載の発明において、上記タンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質を、抗体としたものである。

【0025】

また、本発明のうち請求項7に記載の発明は、本発明のうち請求項6に記載の発明において、上記タンパク質を固定したチップは、上記抗体を固定したチップに上記抗体と反応するタンパク質を含む溶液をかけて、上記抗体と反応するタンパク質と上記抗体とを反応させ、上記抗体と反応するタンパク質と上記抗体とを結合させて作成するようにしたものである。

【0026】

また、本発明のうち請求項8に記載の発明は、本発明のうち請求項1～7のいずれか1項に記載の発明において、上記チップに固定されたタンパク質に、元素標識を付けるようにしたものである。

【0027】

また、本発明のうち請求項9に記載の発明は、本発明のうち請求項8に記載の発明において、上記元素標識を、安定同位元素標識としたものである。

【0028】

また、本発明のうち請求項10に記載の発明は、本発明のうち請求項8～9のいずれか1項に記載の発明において、上記元素標識を、ピューロマイシン誘導体

を用いて標識するようにしたものである。

【0029】

また、本発明のうち請求項11に記載の発明は、本発明のうち請求項8～9のいずれか1項に記載の発明において、上記元素標識を、サンドイッチ法により標識するようにしたものである。

【0030】

また、本発明のうち請求項12に記載の発明は、本発明のうち請求項8～9のいずれか1項に記載の発明において、上記元素標識は、サンプル中のタンパク質に直接標識されたものであるようにしたものである。

【0031】

また、本発明のうち請求項13に記載の発明は、本発明のうち請求項8～12のいずれか1項に記載の発明において、上記チップを、マルチチャンネル化したチップとしたものである。

【0032】

また、本発明のうち請求項14に記載の発明は、本発明のうち請求項1～10または請求項13のいずれか1項に記載の発明において、分析の対象であるタンパク質を含むサンプルと該分析の対象であるタンパク質に標識を付けた標識タンパク質溶液とを混合して上記チップにかけて、上記に固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質と上記分析の対象であるタンパク質と上記標識タンパク質とを競合的に結合させる competitive assayを行い、上記チップ上に該特定のタンパク質を固定するようにしたものである。

【0033】

また、本発明のうち請求項15に記載の発明は、本発明のうち請求項1～14のいずれか1項に記載の発明において、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする超短パルスレーザー光を、パルス時間幅が10ピコ秒以下であり、尖頭値出力が10メガワット以上であるようにしたものである。

【0034】

また、本発明のうち請求項16に記載の発明は、本発明のうち請求項15に記

載の発明において、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションする超短パルスレーザー光を、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下であるようにしたものである。

【0035】

また、本発明のうち請求項17に記載の発明は、本発明のうち請求項1～16のいずれか1項に記載の発明において、タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と分析の対象であるタンパク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、該タンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光により該分析の対象であるタンパク質を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしたものである。

【0036】

また、本発明のうち請求項18に記載の発明は、本発明のうち請求項1～17のいずれか1項に記載の発明において、上記イオン化した構成元素の分析は、飛行時間法による質量分析であるようにしたものである。

【0037】

ここで、本発明において超短パルスレーザー光によりタンパク質をアブレーションする際には、タンパク質に超短パルスレーザー光を1ショット（1パルス）照射すれば十分である。しかしながら、タンパク質に超短パルスレーザー光を複数ショット（複数パルス）照射してもよく、タンパク質へ照射する超短パルスレーザー光のショット数（パルス数）は適宜に選択すればよい。

【0038】

また、超短パルスレーザー光とは、パルス時間幅が10ピコ秒以下であることが好ましく、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下の通常はフェムト秒レーザーと称されるレーザーから照射されるフェムト秒レーザー光を用いるのが適当である。

【0039】

また、超短パルスレーザー光の尖頭値出力としては、10メガワット以上が好

ましく、さらに詳細には、1ギガワット以上10ギガワット以下が好ましい。

【0040】

その理由は、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が10ギガワット以上に大きいと、多価イオンが生成されて質量スペクトルの解析が困難となる恐れがあり、超短パルスレーザー光の尖頭値出力が10メガワット以下であると、原子化・イオン化の効率が低下して原子イオン信号を観測することが困難となる恐れがあるからである。

【0041】

なお、後述する本願発明者による実験によれば、例えば、パルス時間幅が110フェムト秒、尖頭値出力2ギガワットの場合には、極めて良好な結果を得ることができた。

【0042】

また、本発明によれば、原子化と同時にイオン化を効率良く行うことのできるフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を、同位元素などで標識したタンパク質試料に照射するようにしている。このため、標識元素を選択的にイオン化する必要が無くなり、種々様々な標識元素を使用することが可能となる。その上、レーザー照射の繰り返しレートを数kHzまで上げることが可能であるため、高速解析に適している。

【0043】

また、本発明では、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの分析の対象の各種のタンパク質をアブレーションする短パルスレーザー光と当該分析の対象であるタンパク質とは、少なくともいずれか一方を移動させることにより、当該短パルスレーザー光により当該分析の対象であるタンパク質を遺漏、重複なくアブレーションして分析を行うようにしている。即ち、本発明においては、例えば、短パルスレーザー光のスポットと試料として分析の対象であるタンパク質を固定したチップとの移動により、広い面積にわたって固定された多数のタンパク質試料を遺漏・重複することなくアブレーションすることを可能にしている。

これは、分析したい対象のタンパク質に対する抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップなどを利用することを可能とするものであって、特に有効である。

【0044】

本発明によれば、これらの特徴から、解析速度が従来と比較して格段に早くなる。

【0045】

ここで、本発明の具体的な応用例としては、例えば、上記したような抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いたタンパク質の解析があり、その解析を高速化することが可能となる。

【0046】

この際に、本発明によれば、標識として元素標識を用いることが可能となる。さらに詳細には元素標識として、多種類の同位元素を用いることが可能となり、元素標識として、例えば、安定同位元素を用いれば、標識の種類は多種類の安定同位体の数（270種類）にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2～6種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができることを意味している。

【0047】

より詳細には、抗体を固定したチップに抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いたタンパク質解析の実験で使用する標識として、例えば、周期律表において1族の安定同位体である ^{39}K 、 ^{41}K など、周期律表において16族の安定同位体である ^{32}S 、 ^{34}S など、周期律表において17族の安定同位体である ^{13}C 、 ^{12}C など、周期律表において遷移金属の安定同位体である ^{118}Sn 、 ^{120}Sn などの安定同位元素でタンパク質を標識して使うことが可能となる。

【0048】

タンパク質を上記チップ上のターゲットとなるタンパク質と結合させたのち、超短パルスレーザーでアブレーションし、分子の原子イオン化を行い、その後に

、例えば、質量分析器で質量を検出すれば、結合したタンパク質内に含まれていた同位元素の量を定量できる。従って、標識分子の量比を計算することによりターゲットとなるタンパク質を分析することができる。

【0049】

ここで、現在利用されている標識と比較すると例えば、安定同位元素を使えば、標識の種類を270種にも増やすことができる。

【0050】

さらに、別々の元素でラベルした3種類以上の複数のタンパク質を混合し、同時にターゲットと結合反応させたマルチチャンネル化したチップを用いると、複数試料間のデータを比較することができる。

【0051】

このように、本発明によって、多種類の安定同位元素標識による高感度・高速質量分析法を確立することができるものであり、従って、本発明は、蛍光色素や放射性同位元素で標識を行っている全ての研究分野へ応用可能である。

【0052】

また、本発明によれば、標識元素に放射性同位元素を用いることなく、安定同位元素を用いることができるので、その場合には使用される施設に制限を受けないため、医療施設や民間企業への設置も可能となる。

【0053】

【発明の実施の形態】

以下、添付の図面を参照しながら、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法の実施の形態の一例を詳細に説明するものとする。

【0054】

本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法によれば、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質を分析することができる。

【0055】

図1には、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方

法を実施する際に用いることが可能な分析システムの一例として、タンパク質の質量を分析するための質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図が示されている。

【0056】

この質量分析システム10は、例えば $10^{-8} \sim 10^{-6}$ Torrの真空度に設定可能な真空槽12と、この真空槽12内に配置されたターゲット14と、真空槽12内に配置された質量分析器としての四重極質量分析器16と、ターゲット14を回転する回転導入端子18と、例えばフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を出射してターゲット14へ照射する超短パルスレーザー20と、超短パルスレーザー20から照射された超短パルスレーザー光をターゲット14上へ集光するフォーカスレンズ22とを有している。

【0057】

ここで、超短パルスレーザー20としては、フェムト秒レーザーなどのような、例えば、パルス時間幅が1フェムト秒以上1ピコ秒以下であり、尖頭値出力が1ギガワット以上10ギガワット以下である超短パルスレーザー光を照射可能なものを用いることができる。

【0058】

より詳細には、こうした超短パルスレーザー20は、例えば、チタンサファイアレーザーにより構成され、以下に示すようなパラメータを備えているものを用いることができる。即ち、

ピーク幅 (パルス時間幅) : ~ 110 fs (フェムト秒)
出力 : $50 \sim 480$ μ J (マイクロジュール)
(尖頭値出力: $0.5 \sim 4$ GW (ギガワット))
波長 : ~ 800 nm (ナノメートル)
繰り返し : 1 kHz (キロヘルツ)

である。

【0059】

また、四重極質量分析器 16 は、超短パルスレーザー 20 から出射されてターゲット 14 に照射される超短パルスレーザー光の照射方向に対して、90 度垂直方向に設置されている。

【0060】

なお、質量分析器としては、上記した四重極質量分析器 16 に代えて、飛行時間型質量分析器 (TOF MASS) を用いるようにしてもよいことは勿論である。

【0061】

また、超短パルスレーザー 20 から出射された超短パルスレーザー光を集光するフォーカスレンズ 22 の焦点距離は、例えば、2.5 cm に設定されている。

【0062】

以上の構成において、上記した質量分析システム 10 などを用いて、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法により質量分析を行う手法について説明する。

【0063】

ここで、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、フェムト秒レーザーなどの超短パルスレーザー 20 から出射された超短パルスレーザー光によるアブレーションと、四重極質量分析器 16 や飛行時間型質量分析器などのような質量分析器などの分析器による分析とを用いて、生体から採取した検体に含まれるタンパク質などの各種のタンパク質の試料を検出して分析を行うものである。

【0064】

即ち、本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法は、分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して当該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、当該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり

、タンパク質を固定したチップに対して当該超短パルスレーザー光を照射して、当該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、当該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析するものである。

【0065】

具体的には、タンパク質を固定したチップをターゲット14として真空槽12内に配置し、ターゲット14たるチップに超短パルスレーザー20から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器16あるいは飛行時間型質量分析器などの質量分析器により分析するものである。

【0066】

この際に、分析の対象となるタンパク質に元素標識などにより標識を付しておくようにすると、標識を付したタンパク質を固定したチップをターゲット14として真空槽12内に配置し、ターゲット14たるチップに超短パルスレーザー20から出射されたフェムト秒レーザー光などの超短パルスレーザー光を照射してアブレーションを行って、四重極質量分析器16あるいは飛行時間型質量分析器などの質量分析器により標識元素を測定することにより、分析対象となるタンパク質を検出して分析することができる。

【0067】

ここで、タンパク質を固定したチップは、例えば、チップに固定された特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質（抗体など）に、タンパク質が反応して結合することにより、当該チップ上にタンパク質が固定されたものを用いることができる。具体的には、タンパク質を固定したチップは、例えば、分析の対象であるタンパク質に対する抗体を固定したチップに、抗原抗体反応でタンパク質が固定されたチップを用いることができる。

【0068】

従って、標識したタンパク質を固定したチップは、例えば、以下のようにして作成することができる。

【0069】

即ち、特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質（抗体など）を固定したチップに、サンプルたる標識したタンパク質の溶液をかけるなどして、標識したタンパク質と上記特異的な結合をする物質とを反応させ、標識したタンパク質の中の特定のタンパク質をチップに固定する。さらに、標識したタンパク質の中の特定のタンパク質を固定したチップの洗浄を行うことにより、標識したタンパク質を固定したチップが得られる。

【0070】

ここで、DNAチップと同様に、一枚のチップ上にそれぞれ特定のタンパク質と特異的な結合をする物質（抗体など）を何種類も固定したチップを用いて、当該何種類もの特異的な結合をする物質（抗体など）とそれぞれ結合したタンパク質を固定したチップを用いることにより、同時に多種類のタンパク質について測定することが可能となる。

【0071】

また、チップに固定する特定のタンパク質に対して特異的な結合をする物質としては、タンパク質と特異的な結合性を持った分子や、さらには、抗原抗体などのようにタンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質を用いることができる。

【0072】

なお、タンパク質と特異的な結合性を持った分子としては、例えば、抗体と同じような特異的結合をするアプタマーと呼ばれる核酸を用いることができる。アプタマーは、ランダムに合成したオリゴヌクレオチドのプールより、タンパク質などのターゲットとなる物質と結合性を高いものを選択する S E L E X と称される手法を使って作成することができる。

【0073】

また、抗原抗体などのようにタンパク質同士の特異的な結合作用を発揮するタンパク質としては、抗原抗体の他に、リガンドとレプターや、複合体を形成するタンパク質など生体内で特異的に結合することがわかっているものなどを用いることができる。

【0074】

ここで、上記した本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法の一例について、図2を参照しながらより詳細に説明する。

【0075】

即ち、上記した本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法においては、まず、検出したいタンパク質に対する抗体102を固定したチップ100を作成する。

【0076】

次に、検出したいタンパク質をインビトロ翻訳 (*in vitro translation*) などで合成し、当該タンパク質に含まれない元素 (例えば、S, e, Eu, Sm, Tb, Feなどの安定同位元素) で標識 (ラベル) して標識タンパク質104を作成する。

【0077】

ここで、標識方法としては、例えば、セレメチオニン法、ピューロマイシン誘導体を用いた *in vitro virus* 法などを用いることができる。

【0078】

なお、*in vitro virus* 法では、蛍光色素による標識などが一般的であるが、元素標識体を合成し、蛍光色素による場合と同様な方法で元素標識することができる。

【0079】

次に、合成した標識タンパク質104の濃度を変えた溶液を何種類か測定して、検量線をとっておく。

【0080】

次に、生体から採取したサンプル106 (例えば、血清など) と濃度調整をした標識タンパク質溶液を混合し、混合したものをチップ100にかけて *competitive assay* し、抗原抗体反応により、抗体102と標識タンパク質104ならびにサンプル106中に含まれる目的のタンパク質108とを競合的に結合させる *competitive assay* を行い、抗体102と標

識タンパク質 104 ならびにサンプル 106 中に含まれる目的のタンパク質 108 とが結合して固定されたチップ 100 を洗浄して乾燥させた後に、この目的のタンパク質 108 が固定されたチップ 100 をターゲット 14 として超短パルスレーザー 20 からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器 16 や流飛行時間型質量分析器により標識元素を測定することにより、標識タンパク質 104 が抗体 102 と反応した量を測定して、サンプル 106 中に含まれる目的のタンパク質 108 の濃度を検出して分析するものである。

【0081】

ここで、チップの状態により検量線に違いが生じる可能性があるので、それを防ぐためには、検量線の作成とサンプルの測定とを同じチップ上で同時に行うことが望ましい。

【0082】

即ち、こうした問題点を解決するためには、抗体と標識タンパク質ならびにサンプル中に含まれる目的のタンパク質とが結合したチップをマルチチャンネル化すればよく、このマルチチャンネル化により、上記した本発明による手法の精度をさらに上げることができる。

【0083】

このマルチチャンネル化は、例えば、以下に説明する手法により実現することができる。

【0084】

つまり、チップの状態により検量線に違いが生じる可能性があるので、それを防ぐためには、検量線の作成とサンプルの測定とを同じチップ上で同時に行うことが望ましいものであり、そのために、A というタンパク質の測定をしようとするとき、濃度毎に異なる標識（例えば、Fe の同位体何種類かで標識する。）をした標識タンパク質の溶液を準備し、これをサンプルと混合して抗体を固定したチップに反応させると、検量線作成とサンプル測定を同時に行うことが可能となる。

【0085】

次に、測定したいタンパク質を標識する手法としては、上記したようなサンプルと混合する前に標識タンパク質を予め合成する方法の他に、抗体を使ったサンドイッチ法を用いるようにしてもよい。このサンドイッチ法について、図3を参照しながら説明する。

【0086】

このサンドイッチ法においては、まず、検出したい目的のタンパク質に対する抗体202を固定したチップ200にサンプル206を反応させ、サンプル206中に含まれる目的のタンパク質208と抗体202とを結合させる。

【0087】

次に、抗体202と結合したサンプル206中に含まれる目的のタンパク質208の上から、標識元素210により標識した抗体（標識抗体）212をかけ、サンプル206中に含まれる目的のタンパク質208と標識抗体212とを反応させて結合する。

【0088】

次に、抗体202とタンパク質208と標識元素210により標識した標識抗体212とが結合したチップ200を洗浄して乾燥させた後に、このチップ200をターゲット14として超短パルスレーザー20からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器16や流飛行時間型質量分析器により標識元素210を測定することにより、サンプル206中に含まれる目的のタンパク質208の濃度を検出して分析するものである。

【0089】

また、サンドイッチ法としては、上記に限られるものではなく、例えば、検出したい目的のタンパク質をサンドイッチして挟み込む際の上側の抗体の産生動物をチップに固定した抗体と違ったものを選び、標識2次抗体をさらに上からかけて検出するようにしてもよい。

【0090】

また、測定したいタンパク質を標識する手法としては、サンプル中のタンパク質を直接標識する手法を用いてもよい。

【0091】

具体的には、例えば、サンプル中に含まれるタンパク質をヨードでラベルするようにしてもよい。このタンパク質をヨードでラベルする手法としては、例えば、Iodo-Bead法（Pierce社の商標）を用いて行うことができる。

【0092】

そして、サンプル中のタンパク質を直接標識したサンプルを用いる場合には、当該サンプルを、検出したい目的のタンパク質に対する抗体を固定したチップにかけて、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とを反応させ、抗原抗体反応により、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とを結合する。

【0093】

次に、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質と抗体とが結合したチップを洗浄して乾燥させた後に、このチップをターゲット14として超短パルスレーザー20からのフェムト秒レーザー光を照射してアブレーションを行い、四重極質量分析器16や流飛行時間型質量分析器により標識元素を測定することにより、サンプル中に含まれる検出したい目的のタンパク質の濃度を検出して分析するものである。

【0094】

以下に、上記した質量分析システム10を用いて、本願発明者が行った質量分析の実験結果について説明する。

【0095】

まず、ターゲット14となるチップの作成について、図4を参照しながら説明する。このチップの作成は、以下のようにして行う。

【0096】

即ち、ポリ-L-リジンコートスライドガラスを基板1000として用いた。こ

のポリ-L-リジンコートスライドガラスは、スライドガラスをNaOH処理後に3%ポリ-L-リジン溶液に1時間浸漬し、水で洗浄後に80℃で乾燥させて作成した。次に、ウサギ抗ヒトヘモグロビン抗体（シグマ社製）、ウサギ抗ヒトIgG抗体をPBSに各々0.2mg/mlの濃度で分解し、上記のようにして作成したポリ-L-リジンコートスライドガラスにそれぞれスポッティングした（図4参照：スポット1はウサギ抗ヒトIgG抗体であり、スポット2はウサギ抗ヒトヘモグロビン抗体である。）。そして、3%non-fat milk, 0.1%Tween-20を含むPBS溶液で余分な抗体を除去した後に、3%non-fat milk, 0.02%アジ化ナトリウムを含むブロッキング溶液に浸漬し、4℃で一晩静置した。さらに、10,000x g で10分間遠心後に、PBSで洗浄してブロッキング溶液を除去し、抗体を固定したチップを作成した。

【0097】

次に、タンパク質の調製とチップに固定された抗体との反応を行う。このタンパク質の調製と反応は、以下のようにして行う。

【0098】

ヒトヘモグロビン（和光純薬工業製）をPBSに2mg/mlの濃度で溶解し、タンパク質の溶液を調製した。抗体を固定したチップから余分なPBSを振り落とし、すぐにタンパク質溶液を抗体を固定したチップ表面に載せ、上からカバーガラスを静かに被せ、4℃で2時間静置した。その後、当該チップをPBSに浸漬してカバーガラスとタンパク質溶液を除き、0.005M Tris-HCl、0.005%Tween20, pH7.8処理し、続いてPBSで処理した後に乾燥して、ターゲット14となるチップを得た。

【0099】

ここで、基板の材質はガラスである必要はなく、金属や絶縁体であっても良い。超短パルスレーザー光を用いたレーザーアブレーションでは、熱伝導度の高い基板が、より高いイオン検出効率を与える。なお、基板としては固体を用いるものであり、この基板として用いる固体の熱伝導率は $0.1\text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ 以上であることが好ましい。

【0100】

上記のようにして作成したターゲット14を真空槽12内に装着して、真空槽12内を真空に引いて、真空槽12内の真空度が 10^{-6} Torr以下となるように設定する。

【0101】

次に、超短パルスレーザー20から出射された超短パルスレーザー光を、フォーカスレンズ22を用いてターゲット14上に集光して、ターゲット14上に形成されたスポット1またはスポット2をアブレーションする。

【0102】

なお、超短パルスレーザー20から出射される超短パルスレーザー光のパルス幅は110フェムト秒であり、出力は $230\mu\text{J}$ である。

【0103】

そして、四重極質量分析器16によって、ターゲット14への超短パルスレーザー光の照射により発生した一価のイオンの質量を測定した。

【0104】

図5には、上記した手法により、四重極質量分析器16によって測定されたスポット1ならびにスポット2のアブレーションによる質量スペクトラムが示されている。また、図6は、図5に示されたスポット2のアブレーションにより測定された質量スペクトラムのみを抽出して示すものである。

【0105】

これら図5ならびに図6に示す実験結果から明らかなように、スポット2からはFeが検出され、本発明の手法によりヘモグロビンを検出することができた。

【0106】

なお、上記した実験においては、検出しようとするタンパク質に元素標識を付さなかったが、元素標識を付たものも解析することができるのは勿論である。

【0107】

即ち、超短パルスレーザーにより単数または複数の同位体元素で標識したタン

パク質をアブレーションすることにより、構成元素を完全に原子イオン化し、イオン化した標識元素を質量分析することによりタンパク質の定量測定を行うことができる。これにより、多種類の同位体元素を標識として使用することができるようになる。従って、質量分析することができるタンパク質の対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。

【0108】

つまり、本発明によって、同位体元素で標識したタンパク質それ自体を原子レベルでイオン化し、標識元素を検出することが可能となるから、質量分析可能な対象範囲を飛躍的に広げることができるようになる。例えば、標識として同位体元素を用いることが可能となり、標識の種類をたとえば安定同位体元素の数である270にも増やすことができる。これは、従来の標識法である蛍光法（2種類）や放射性同位元素（約10種類）と比較して、飛躍的に情報量を増やすことができる。

【0109】

なお、上記した実施の形態においては、質量分析器として四重極質量分析器を用いるようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、上記したように原子の飛行時間を測定することにより質量分析を行う飛行時間質量分析器を用いることができ、その場合には、一回のレーザー照射で複数の原子の質量分析を同時に行うことができる。また、質量分析器としてイオンサイクロトロン型フーリエ変換質量分析器を用いた場合にも、複数の原子の質量分析を同時に行うことが可能となる。

【0110】

また、上記した実施の形態においては、タンパク質の分析方法として質量分析に関して説明したが、これに限られるものではないことは勿論であり、質量分析以外の分析に関して本発明を用いるようにしてもよい。

【0111】

また、上記した実施の形態においては、ターゲット 14 を移動する移動手段として、ターゲット 14 を回転する回転導入端子 18 を用いたが、これに限られるものではないことは勿論であり、ターゲット 14 を載置可能な移動自在のテーブルなどの適宜の移動手段を用いるようにしてもよい。

【0112】

また、上記した実施の形態においては、回転導入端子 18 を用いてターゲット 14 を回転することにより、ターゲット 14 を遺漏・重複なくアブレーションするようにしたが、これに限られるものではないことは勿論であり、超短パルスレーザー光のターゲットへの照射位置を移動する移動手段を設けるようにして、ターゲット 14 を遺漏・重複なくアブレーションするようにしてもよい。

【0113】

【発明の効果】

本発明は、以上説明したように構成されているので、タンパク質を構成する構成原子の原子イオンを生成し、生成した原子イオンを分析するようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、高分解能の分析装置を要しないようにしたレーザーアブレーションを用いたタンパク質の質量分析方法を提供することができるという優れた効果を奏する。ここで、より詳細には、例えば、質量分析を行う場合には、質量スペクトルの解析が困難になる恐れを排除することができるとともに、高分解能の質量分析装置を必要とすることがないという優れた効果を奏する。

【0114】

また、本発明は、以上説明したように構成されているので、システム構成を大幅に簡潔化することができるという優れた効果を奏する。

【0115】

さらに、本発明は、以上説明したように構成されているので、多種類の標識同位体が混入した状況においても、効率の良い分析を行うことができるようになるという優れた効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法を実施する際に用いることが可能な分析システムの一例たる、タンパク質の質量を分析するための質量分析システムの構成の一例の概念構成説明図である。

【図 2】

本発明によるレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法の一例を示す説明図である。

【図 3】

測定したいタンパク質を標識する手法として、抗体を使ったサンドイッチ法を説明するための説明図である。

【図 4】

本願発明者による実験に用いたターゲットとなるチップの説明図である。

【図 5】

本願発明者による実験結果を示し、四重極質量分析器によって測定されたスポット 1 ならびにスポット 2 のアブレーションによる質量スペクトラムを示すグラフである。

【図 6】

図 5 に示されたスポット 2 のアブレーションにより測定された質量スペクトラムのみを抽出して示すグラフである。

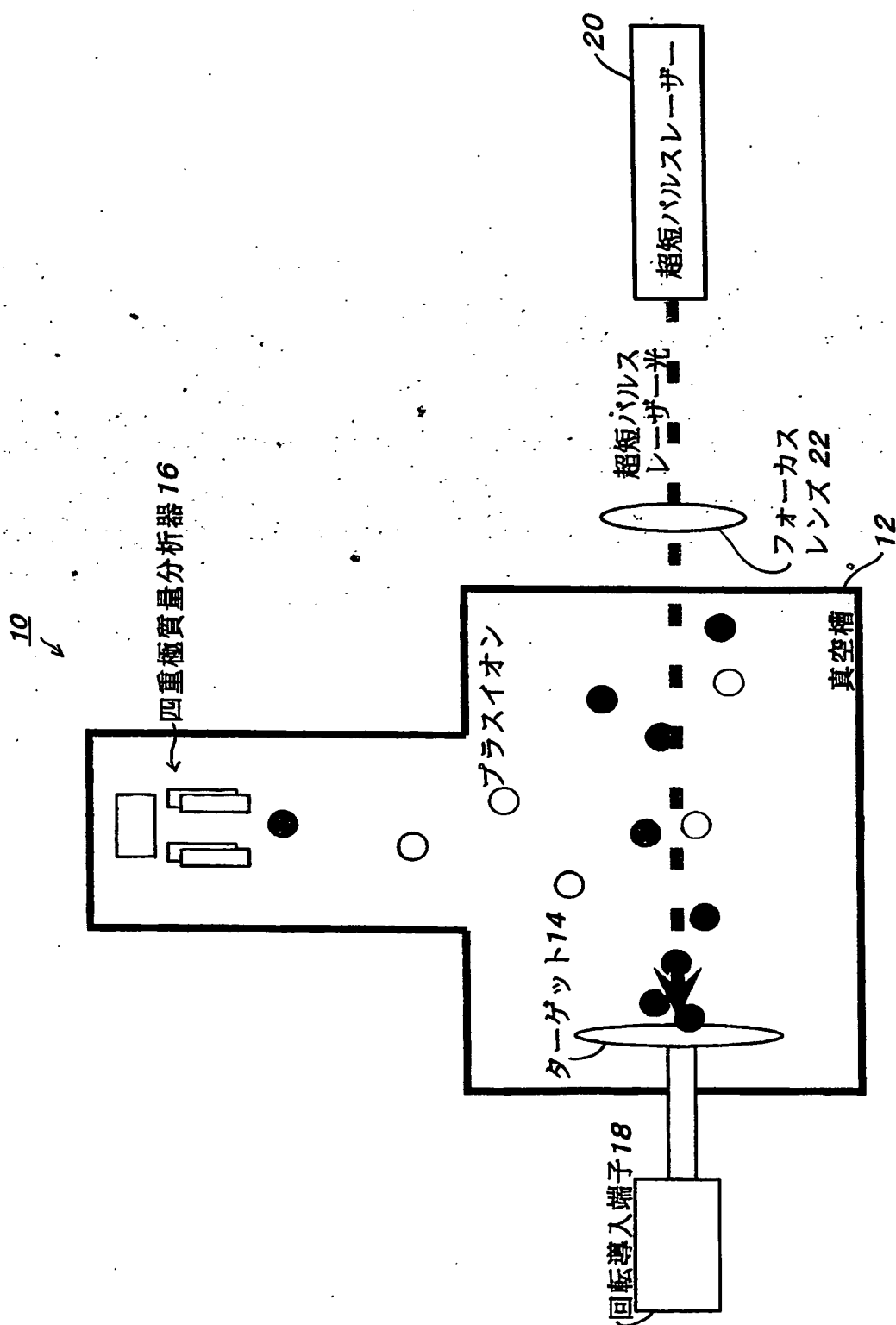
【符号の説明】

10	質量分析システム
12	真空槽
14	ターゲット
16	四重極質量分析器
18	回転導入端子
20	超短パルスレーザー
22	フォーカスレンズ
100	チップ
102	抗体
104	標識タンパク質

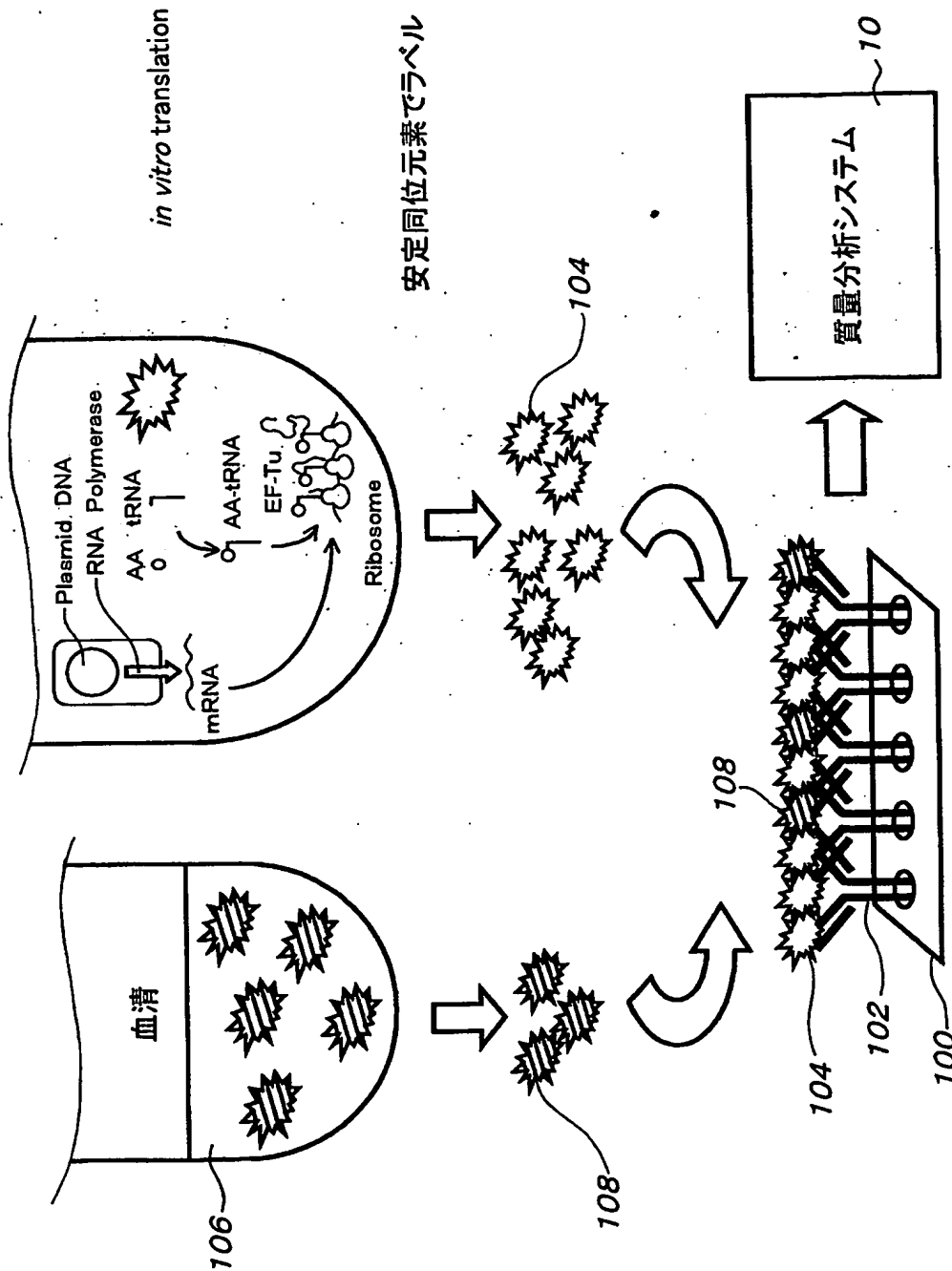
106	サンプル
108	サンプル中に含まれる目的のタンパク質
200	チップ
202	抗体
206	サンプル
208	サンプル中に含まれる目的のタンパク質
210	標識元素
212	抗体 (標識抗体)
1000	基板

【書類名】 図面

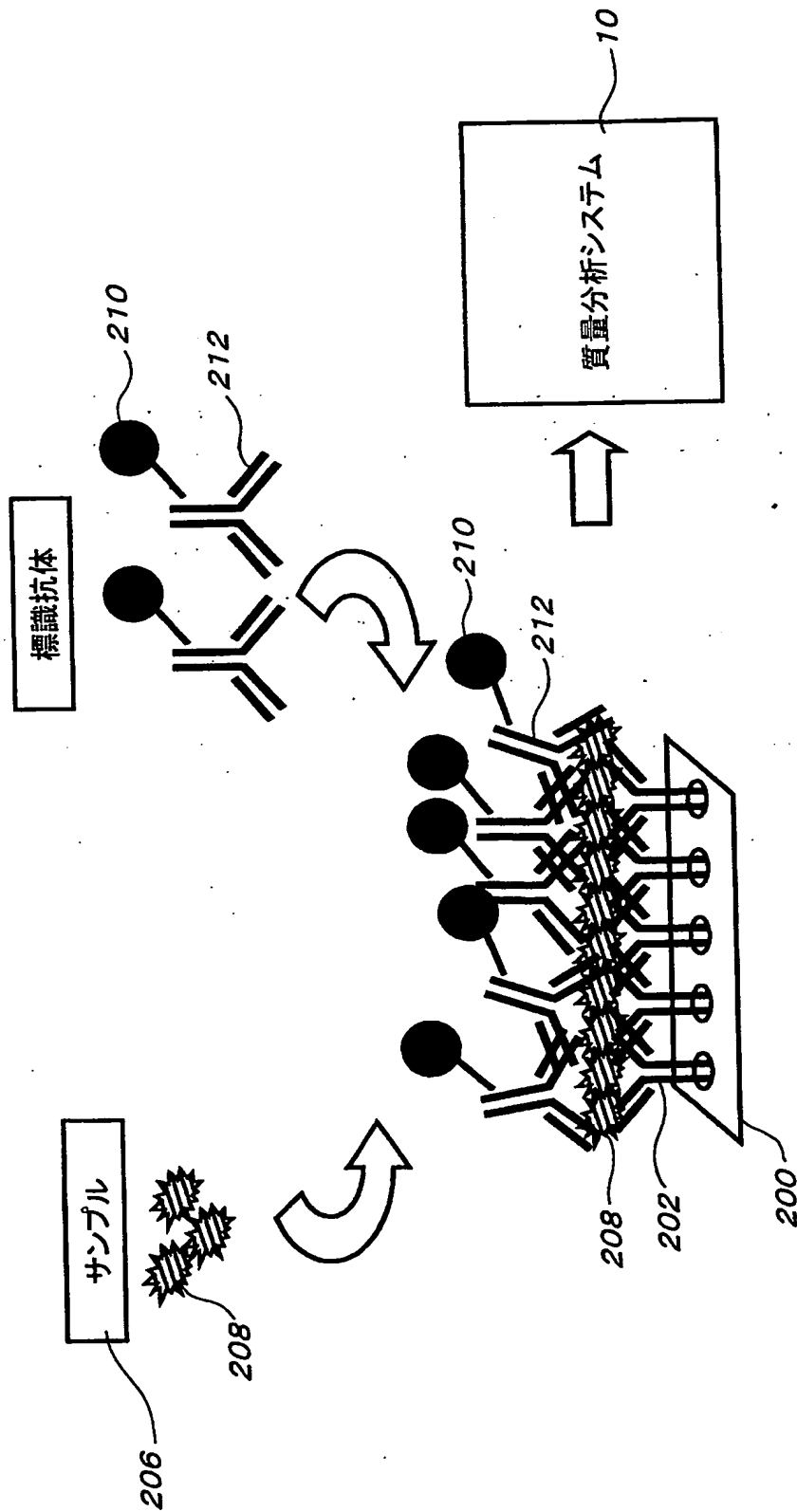
【図 1】



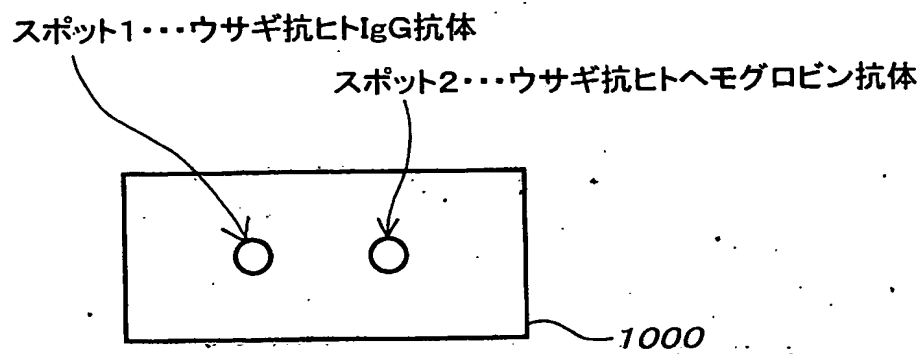
【図2】



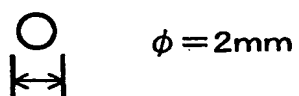
【図3】



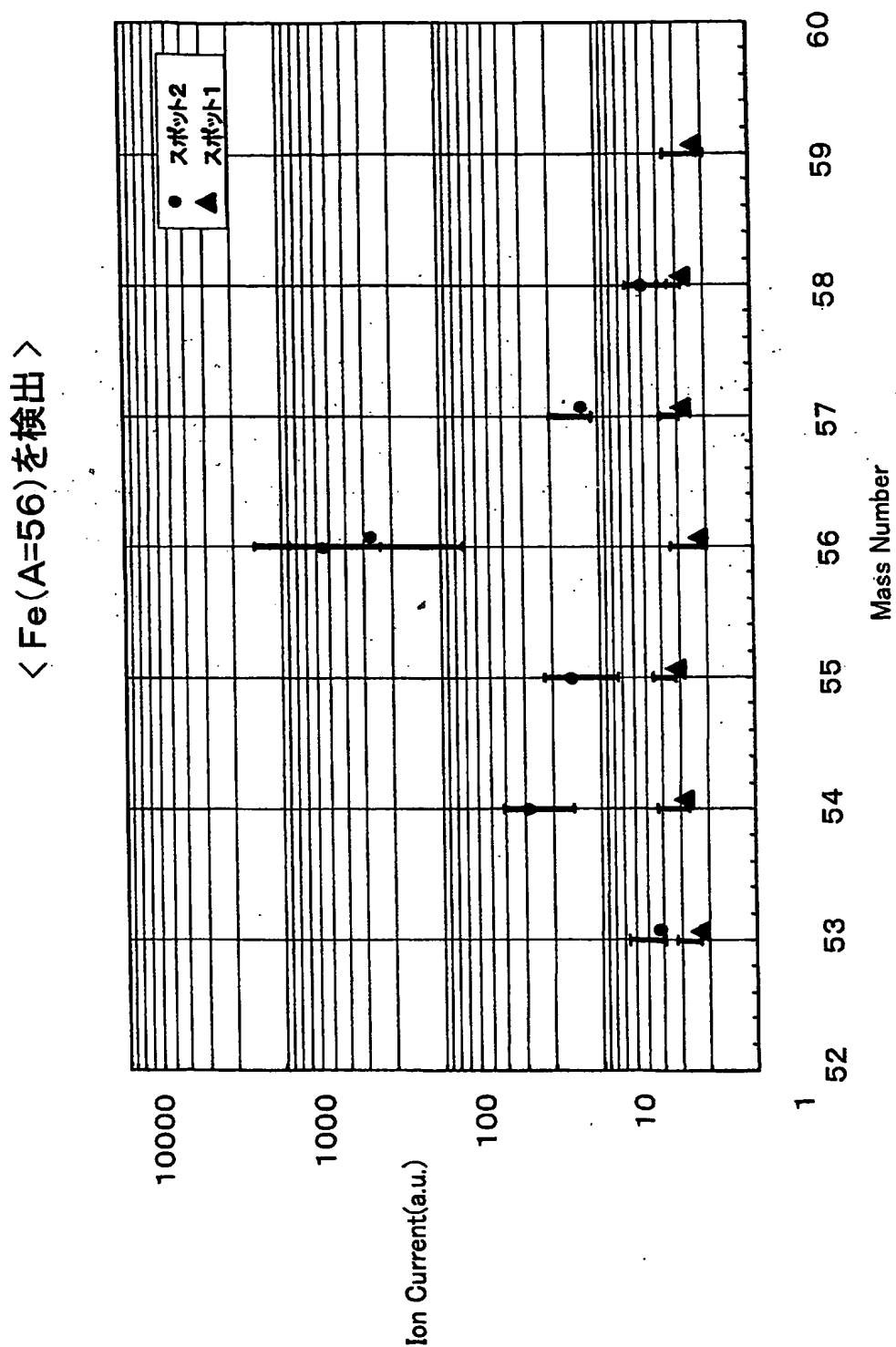
【図 4】



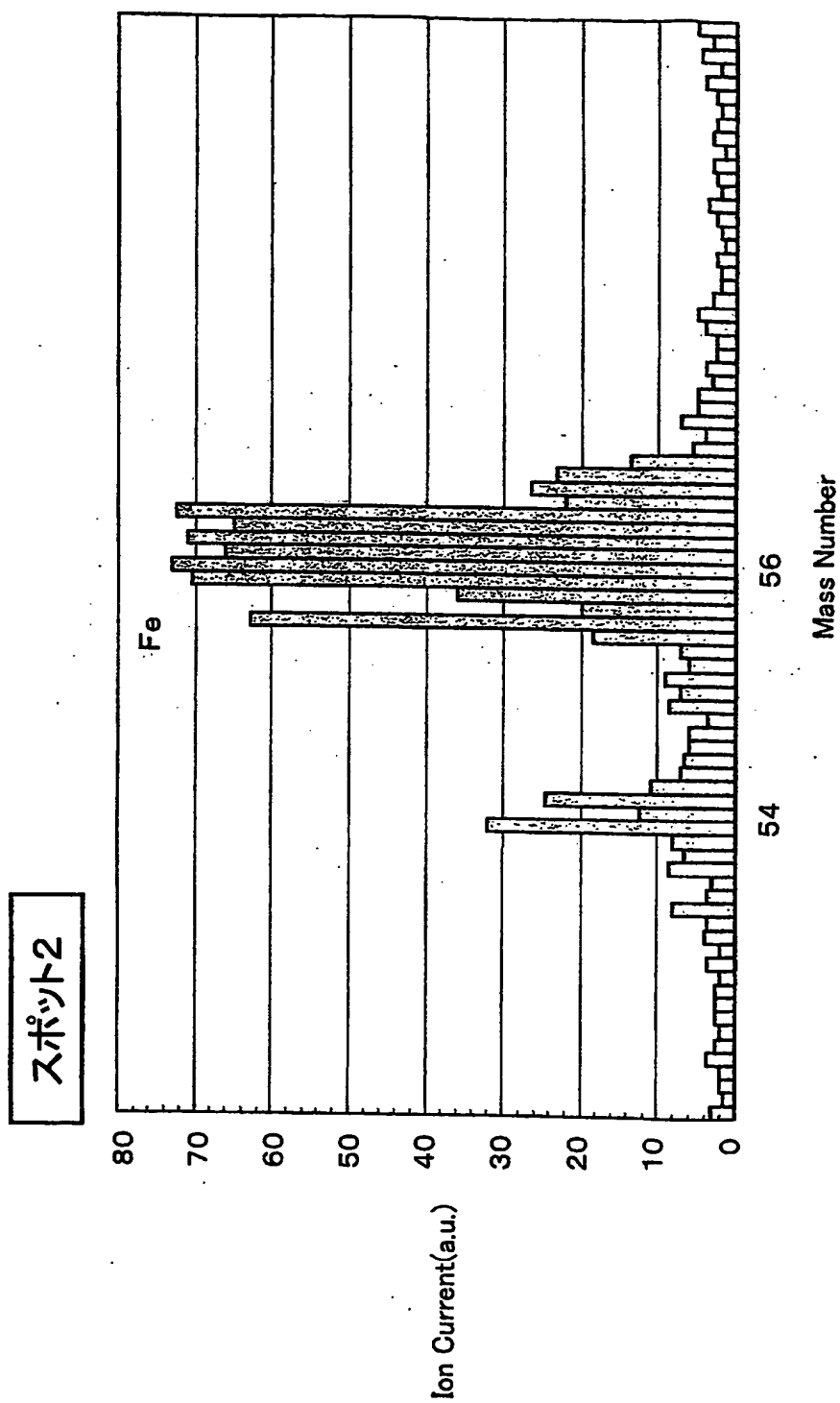
スポットの大きさ



【図5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質を構成する構成原子の原子化とイオン化とを単一のレーザー源で同時に実現する。

【解決手段】 分析の対象であるタンパク質にレーザー光を照射して該タンパク質をアブレーションすることにより、タンパク質を構成元素に原子化し、原子化した構成元素をイオン化し、イオン化した構成元素を分析するレーザーアブレーションを用いたタンパク質の分析方法であって、分析の対象であるタンパク質に照射して、該タンパク質をアブレーションするレーザー光は超短パルスレーザー光であり、タンパク質を固定したチップに対して該超短パルスレーザー光を照射して、該チップに固定されたタンパク質を超短パルスレーザー光でアブレーションすることによって、該タンパク質を構成元素に原子化すると同時にイオン化し、イオン化した構成元素を分析する。

【選択図】 図 2

特願 2002-245706

出願人履歴情報

識別番号

[597157174]

- | | |
|----------|--------------------|
| 1. 変更年月日 | 1997年11月10日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住所 | 茨城県つくば市稲荷前22-1-201 |
| 氏名 | 林崎 良英 |
| | |
| 2. 変更年月日 | 2002年 3月18日 |
| [変更理由] | 住所変更 |
| 住所 | 茨城県つくば市稲荷前22-8 |
| 氏名 | 林崎 良英 |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.